

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(14)

(D3)

011

E8

PATENT BUREAU OF JAPAN
OFFICIAL GAZETTE FOR UNEXAMINED PATENTS

B43

Japanese Patent Application Publication Kokai: Sho 63-58149

Publication Date: March 12, 1988

Number of Inventions: 1

Request for Examination: Not Requested

(Total of 4 pages)

International Class

Japanese Classification

Intrabureau Number

G 01 N 27/46
27/30

M-7363-2G
E-7363-2G

BIOSENSOR

Application No.: Sho 61-202217

Application Date: August 28, 1986

Inventors Kenichi Morikaki
c/o Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.
1006 Oaza Kadoma, Kadoma-shi, Osaka-fu

Shigeo Kobayashi
c/o Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.
1006 Oaza Kadoma, Kadoma-shi, Osaka-fu

Applicant: Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.
1006 Oaza Kadoma, Kadoma-shi, Osaka-fu

Agent: Toshio Nakao, patent attorney, and one other

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

Biosensor

2. Claims

(1) A biosensor comprising a biosensor that measures the substrate concentration in a sample solution by providing an electrode system composed of at least a measurement electrode and counter electrode and electrochemically detecting the changes in the substance concentration by the aforementioned electrode system during reaction of an enzyme, electron acceptor and sample solution, wherein a water-absorbent polymer layer is formed on top of the aforementioned electrode system.

(2) The biosensor of Claim 1 wherein the thickness of the water-absorbent layer is from 0.1 to 100 μm .

(3) The biosensor of Claim 1 wherein the water-absorbent polymer is any of the group composed of a starch system, carboxymethyl cellulose system, gelatin system, acrylate system, vinyl alcohol system, vinyl pyrrolidone system, maleic anhydride system or a mixture of these.

ident
15/
38-48

(4) The biosensor of Claim 1 wherein a solution holding layer made from a hydrophilic porous body is provided on top of the water-absorbent polymer layer.

3. Detailed Explanation of the Invention

Industrial field of utilization

The present invention concerns a biosensor that makes it possible to rapidly and easily determine specific components in various trace biological samples without diluting the sample solution.

Conventional technology

The biosensor shown by Figure 3 was proposed as a method of determining specific components in biological samples such as blood, etc. at high accuracy without conducting procedures such as diluting the sample solution, stirring, etc. in the past. This

biosensor is equipped with measurement electrode 11 and counter electrode 12 which are made of platinum, etc. and the respective leads 13 and 14 embedded in insulating substrate 15. The exposed parts of this electrode system are covered by filtration film 10 to filter substances that interfere with measurement and porous body 16 that contains oxidoreductase and electron acceptor. When sample solution is applied dropwise on top of porous body 16, the electron acceptor in the porous body dissolves in the sample solution and the electron acceptor is reduced by the advance of an enzymatic reaction with the substrate in the sample solution. Giant proteins that interfere with measurement such as the erythrocytes and leukocytes in the blood are filtered out by filtration film 10 from the sample solution that has completed the reaction. The sample reaction solution that contains only low molecular weight substances such as the electron acceptor, salts, etc. falls down on top of measurement electrodes 11 and 12. The aforementioned reduced electron acceptor is electrochemically oxidized on top of the electrode and the substrate concentration in the sample solution is determined from the oxidation current value obtained at this time.

Problems to be resolved by the present invention

However, although such a conventional construction can tentatively be used as a sensor, the sample reaction solution falls unevenly on top of the electrode and the measured values are unstable and the reproducibility poor because of residual air bubbles and decreased electrode surface area since the electrode surface is not wetted satisfactorily.

The present invention resolves such problems and has as its object to make possible stable measurement by forming a stable solution film layer by providing a water-soluble polymer layer on top of the measurement electrode and counter electrode.

Means of problem resolution

In order to resolve these problems, the present invention provides a water-absorbent polymer layer which sufficiently covers the electrode surface on top of the electrode system composed of at least a measurement electrode and counter electrode. Stable measurement is carried out by forming a gelled, homogeneous reacted solution film layer on top of the electrode by absorbing the reacted solution that has undergone reaction of the

enzyme, electron acceptor and sample solution by the aforementioned water-absorbent polymer layer in this way.

Natural polymers that can be used as polymers that gel by absorbing water include a starch system, cellulose system, alginic acid system, gums, proteins, etc. Synthetic polymers include various types such as a vinyl system, acrylic acid system, maleic anhydride system, aqueous urethane system, polyelectrolyte system, etc. However, starch systems, carboxymethyl cellulose systems, gelatin systems, acrylate systems, vinyl alcohol systems, vinyl pyrrolidone systems and maleic anhydride systems are preferred. These may be used individually, as mixtures or copolymers. Since these polymers can easily produce aqueous solutions, the advantage is that a thin film of the necessary thickness can be formed directly on top of the electrode by applying an aqueous solution of the appropriate concentration and drying.

Action

This construction permits stable electrochemical measurement and makes it possible to resolve uneven wetting of the electrode and residual air bubbles, etc. because a gel layer that sufficiently covers the electrode surface is formed in a stable manner by dropping the reacted solution that has undergone reaction of the enzyme, electron acceptor and sample solution on top of the electrode and adhering on top of the electrode by causing the solution to be absorbed in the water-absorbent polymer layer on top of the electrode.

Practical example

A practical example of the present invention is explained below.

A glucose sensor is explained as an example of a biosensor. Figure 1 shows a practical example of a glucose sensor and is a cross-sectional diagram of the sensor construction. Conductive carbon paste is printed by screen printing on insulating substrate 8 which is made of polyethylene terephthalate and an electrode system composed of measurement electrode 6 and counter electrode 7 and the lead part (not shown in the figure) is formed by drying by heating. Next, insulating layer 5 is formed by printing and drying an insulating paste in the same way as described above so as to partially cover the electrode system and obtain a set electrode surface area. Porous body 1 and filtration film 2 having a pore diameter of 1 μm made of polycarbonate are held by holding

frames 3 and 4. The aforementioned porous body 1 was produced by impregnating cellulose paper with a solution obtained by dissolving 100 mg of glucose oxidase which is an oxidoreductase and 150 mg of potassium ferricyanide as an electron acceptor in 1 mL of phosphate buffer (pH 5.6) and drying. 9 is the water-absorbent polymer layer according to the present invention. It is obtained by directly applying a 1% aqueous solution of carboxymethyl cellulose on top of the electrode and drying. The film thickness after drying is 2 μm .

Glucose aqueous solution was applied dropwise as sample solution to porous body 1 of a glucose sensor of the construction described above. The voltage of measurement electrode 6 was swept at a speed of 0.2 V/sec in the direction of the anode. The glucose which was added dropwise produces potassium ferrocyanide by reacting with the potassium ferricyanide under the action of glucose oxidase maintained in porous body 1. The sample reacted solution in which this reaction has been completed penetrates filtration film 2, is absorbed by water-absorbent polymer layer 9 and water-soluble gel layer 9 is formed by the water-absorbent polymer that contains the potassium ferrocyanide which adheres on top of the electrode and completely covers the electrode surface. The potassium ferrocyanide produced is electrochemically oxidized to potassium ferricyanide by sweeping in the direction of the anode as described above, and the peak of the oxidation current is obtained. This oxidation peak current value corresponds to the glucose concentration in the sample.

Figure 2 shows the correlation between this oxidation peak current value and the glucose concentration. A in the figure shows when the carboxymethyl cellulose thin film layer of the present invention was provided. B shows when a thin film layer was not provided in a conventional example. The mean values and the range of fluctuations obtained by measuring each glucose concentration 5 times are shown. A shows good linearity and few fluctuations at each glucose concentration. However, the fluctuations are extremely large in conventional example B and some show abnormally small current values. When the condition on top of the electrode was studied in the case of such small current values, it was understood that only part of the electrode was wetted or air bubbles remained on top of the electrode or between the electrodes. On the other hand, when gel layer 9 is formed by water-absorbent polymer, a solution layer with little fluidity is formed in a stable manner on top of the electrode even when the amount of

filtered solution is small. No residual air bubbles either were seen and the electrode surface was understood to be completely wetted.

The water-absorbent polymer layer of the present invention is understood to act effectively within a specific film thickness range based on the drying condition. This range varies slightly depending on the polymer material. For example, a film thickness of from 0.5 to 50 μm is appropriate in the case of the aforementioned carboxymethyl cellulose. However, a range of from 0.1 to 20 μm is appropriate in the case of the acrylate type polymer Aquakeep 10SH (made by Seitetsu Kagaku Kogyo). As a result of various studies, it was understood that the preferred range is from 0.1 to 100 μm to form a stable gel layer. A stable layer is not obtained owing to ready movement of the solution layer when the film thickness is less than 0.1 μm . Conversely, thick films of more than 100 μm are not appropriate because diffusion of the sample solution is unsatisfactory and ungelled parts develop when there is a tiny amount of sample solution of from several μL to several tens of μL .

Stable values were obtained even when blood was measured as the sample solution by the aforementioned glucose sensor. Although not shown in the figure, placing a thin sheet of a hydrophilic porous body such as cellulose, rayon, etc. between the filtration film 2 and water-absorbent polymer layer 9 as a solution holding layer makes the filtration speed of the sample solution faster and also makes it possible for the filtrate to be absorbed rapidly and evenly in the water-absorbent polymer layer.

A two-electrode system of only a measurement electrode and counter electrode was described in the aforementioned practical example. However, more precise measurement is possible by making a three-electrode system by adding a reference electrode.

p-Benzoquinone, phenadine methosulfate, etc. can also be used in addition to the potassium ferricyanide used in the aforementioned practical example as the electron acceptor. The sensor of the aforementioned practical example can also be used as an alcohol sensor, cholesterol sensor, etc. if alcohol oxidase, cholesterol oxidase, etc. are used besides the glucose oxidase of the aforementioned practical example.

Effects of the present invention

The biosensor of the present invention as described above obtains the effect of making possible stable, accurate measurement by forming a stable gel solution layer that

sufficiently wets the electrode surface even with a small amount of solution by providing a water-absorbent polymer layer on top of the electrode system.

4. Brief Explanation of the Figures

Figure 1 is a cross-sectional diagram of a biosensor which is a practical example of the present invention. Figure 2 is a biosensor response characteristic diagram. Figure 3 is a cross-sectional diagram of a conventional biosensor.

1 ... Porous body, 2 ... filtration film, 5 ... insulating layer, 6 ... measurement electrode, 7 ... counter electrode, 8 ... insulating substrate, 9 ... water-absorbent polymer layer.

Figure 1.

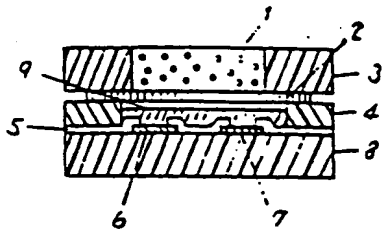


Figure 3.

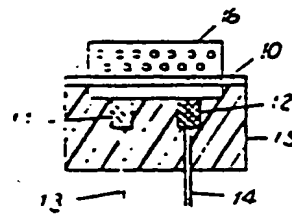
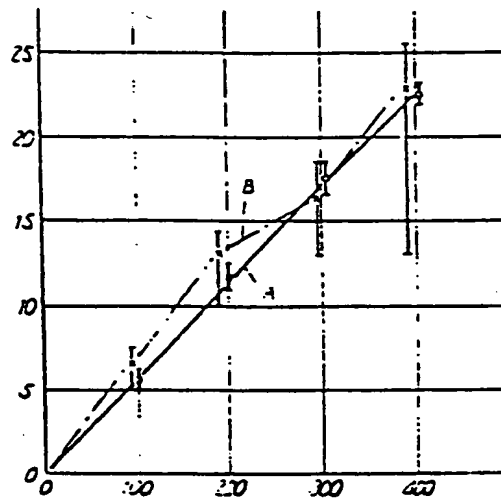


Figure 2.

Peak current value (μA)



Glucose concentration (mg/dL)

- 1 ... Porous body
- 2 ... Filtration film
- 3, 4 ... Holding frames
- 5 ... Insulating layer
- 6 ... Measurement electrode
- 7 ... Counter electrode
- 8 ... Insulating substrate
- 9 ... Water-absorbent polymer layer

14

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-58140

⑪ Int.Cl.

G 01 N 27/46
27/30

識別記号

庁内整理番号

M-7363-2G
E-7363-2G

⑬ 公開 昭和63年(1988)3月12日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 バイオセンサ

⑮ 特 願 昭61-202217

⑯ 出 願 昭61(1986)8月28日

⑰ 発 明 者 森 垣 健 一
⑱ 発 明 者 小 林 茂 雄
⑲ 出 願 人 松下電器産業株式会社
⑳ 代 理 人 弁理士 中尾 敏男

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
大阪府門真市大字門真1006番地
外1名

2

要 旨

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極とからなる電極系を備え、酵素と電子受容体と試料液の反応に基きこの物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、前記試料液中の該物質濃度を測定するバイオセンサであって、前記電極系上に吸水性高分子層を形成したことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 吸水性高分子層の厚さが、0.1～100μmである特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

(3) 吸水性高分子が、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系からなる群のいずれかもしくはそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

(4) 吸水性高分子層の上に吸水性の多孔体からな

る浸液層を設けた特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の種類の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡易に定量することのできるバイオセンサに関するものである。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や検定などの操作を行なうことなく高精度に定量する方式としては、第3図に示すようなバイオセンサが提案されている。このバイオセンサは、絶縁基板15に白金などからなる測定極11と対極12およびそれぞれのリード13、14を埋設し、これらの電極系の露出部を酸化還元酵素および電子受容体を含む多孔体16と測定妨害物質を識別するための透過膜17で覆ったものである。試料液を多孔体16上へ滴下すると、試料液は多孔体中の電子受容体が酵素

して試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。反応が終了した試料液のうち、二液中の赤血球、白血球のような測定を妨害するような巨大タンパク等を透過膜10で透過し、電子受容体、塩類などの低分子量のもののみを含む試料反応液を電極11、12上へ降下させる。電極上では前記の還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られた酸化電流値から、試料液中の基質濃度が求められるものであった。

発明が解決しようとする問題点

しかしこのような従来の構成では、センサとして一応使用できるが、電極上への試料反応液の降下が不均一になり、電極面が十分に濡れないため、気泡が残ったり、電極面積が減少するという現象が生じ、測定値が不安定で、再現性が悪かった。

本発明はこのような問題点を解決するもので、測定極及び対極上に吸水性高分子層を設けることにより、安定な液膜層を形成し、安定した測定を可能とすることを目的とするものである。

必要な厚さの薄膜を電極上に直接形成することができるという利点がある。

作用

この構成により、酵素と電子受容体と試料液とが反応した反応液が電極上へ降下し、電極上の吸水性高分子層に吸収されて、電極上に密着し、電極面を十分に覆ったゲル層が安定に形成されるため、電極の濡れの不均一性や気泡の残留等は解消でき、安定な電気化学的測定ができる。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、グルコースセンサの一実施例を示したもので、センサの構造の断面図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性基板8にスクリーン印刷により、導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、測定極6、対極7からなる電極系と、図面では図示していないがリード部とを形成する。次に、電極系を三分割に覆い、一定の電圧電流が得られ

問題点を解決するための手段

この問題点を解決するために、本発明は少なくとも測定極と対極とからなる電極系上に電極面を十分に覆う吸水性高分子層を設けたものである。これにより、酵素と電子受容体と試料液の反応が終了した反応液を、前記吸水性高分子層が吸収し、電極上にゲル化した均一な反応液液膜層が形成され、安定な測定を行なうものである。

水を吸収してゲル化する高分子として、天然高分子類では、デンプン系、セルロース系、アルギン酸系、ガム類、タンパク質系などがあり、合成高分子類では、ビニル系、アクリル酸系、無水マレイン酸系、水性ウレタン系、ポリ電解質系など種々あるが、特に、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらは、単独または混合物、共重合体であっても良い。これらの高分子は容易に水溶液とすることができ、適当な濃度の水溶液を塗布、乾燥することにより、

るように、絶縁性ペーストを前記同様に印刷、乾燥して絶縁層5を形成する。多孔体1とポリカーボネイト製の孔径1μmの透過膜2は、保持枠3、4に保持されている。前記多孔体1は、酸化還元酵素であるグルコースオキシダーゼ100mgと電子受容体としてフェリシアン化カリウム150mgをリン酸緩衝液(pH5.6)1mlに溶解した液をセルロース紙に含浸、乾燥して作製したものである。9は本発明による吸水性高分子層であり、カルボキシメチルセルロースの1%水溶液を電極上に直接塗布、乾燥して得たもので、乾燥後の膜厚は2μmである。

上記構成のグルコースセンサの多孔体1へ試料液としてグルコース水溶液を滴下し、2分後に測定極6の電位をアノード方向へ0.2V/秒の速度で掃引した。滴下されたグルコースは、多孔体1に保持されたグルコースオキシダーゼの作用で、フェリシアン化カリウムと反応してフェロシアン化カリウムを生成する。この反応で終了した試料液が透過膜2を透過し、吸水性高分子層9に

吸収されて、電極上に密着しかつ電極面積を完全に覆ったフェリシアン化カリウムを含む吸水性高分子による吸水性ゲル層9が形成される。上記のアノード方向への誘引により、生成したフェリシアン化カリウムがフェリシアン化カリウムに電気化学的に酸化され、酸化電流のピークが得られる。この酸化ピーク電流値は試料中のグルコース濃度に対応している。

第2図に、この酸化ピーク電流値とグルコース濃度との関係を示した。図中Aは、本発明のカルボキシメチルセルロース薄膜層を設けた場合で、Bは従来例の薄膜層を設けない場合である。各グルコース濃度でそれぞれ5回測定した平均値とバラツキの値を示している。Aは良い直線性を示し、各グルコース濃度でのバラツキも小さいが、従来例のBではバラツキが非常に大きく、一部で異常に小さい電流値を示した。このように電流値が小さい場合に電極上の状態を調べると、電極上の濡れが悪く、電極の一部分しか濡れていない場合か、または電極上及び電極間に気泡が残留している等

合であることが分った。一方、吸水性高分子によるゲル層9を形成させた場合には、通過された液量が少量であっても、電極上に安定で流動しにくい液層ができ、気泡の残留も見られず、電極面が完全に濡れていることが分った。

本発明の吸水性高分子層は、乾燥状態のもとである一定の膜厚の範囲で有効に作用することが分り、高分子材料によってその範囲は少し異なる。例えば、上記カルボキシメチルセルロースの場合、 $0.5 \sim 50 \mu$ の膜厚が適当であるが、アクリル酸塩系高分子のアクアキープ10SH（製鉄化学工業（株）製）の場合には、 $0.1 \sim 20 \mu$ の範囲が適当である。種々検討した結果、安定なゲル層を形成するには、 $0.1 \sim 100 \mu$ の範囲が好ましいことが分った。 0.1μ 以下の膜厚では、液層が流動しやすく安定なゲル層が得られず、また逆に 100μ よりも厚い膜厚では、試料液が数 μ l〜数十 μ lの液量の場合、試料液の拡散が不十分でゲル化しない部分が生ずるために不適当であることが分った。

さらに、血液を試料液として前記グルコースセンサで測定した場合にも、安定した値が得られた。そして図面では図示していないが、透過膜2と吸水性高分子層9の間に、セルロース、レーヨン等の親水性多孔体の薄片を保護層として介在させた方が、試料液の透過速度がより早くなり、透過液の吸水性高分子層への吸収も迅速、均一に行なうことができた。

上記実施例では、測定極と対極のみの二極電極系について述べたが、参照極を加えた三電極方式にすれば、より正確な測定が可能である。

また、電子受容体としては、上記実施例に用いたフェリシアン化カリウム以外にも、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェートなども使用できる。さらに、上記実施例のセンサは酵素として、上記実施例のグルコースオキシダーゼ以外のアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ等を用いれば、アルコールセンサ、コレステロールセンサなどにも用いることができる。

発明の効果

以上のように本発明のバイオセンサは、電極系上に吸水性高分子層を設けることにより、少量の液量でも十分に電極面を濡らす安定なゲル液層を形成し、安定で正確な測定を可能にするという効果が得られる。

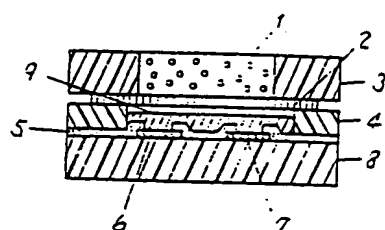
4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの断面図、第2図はバイオセンサの応答特性図、第3図は従来例のバイオセンサの断面図である。

1……多孔体、2……透過膜、3……絶縁層、4……測定極、5……対極、6……絶縁性基板、7……吸水性高分子層。

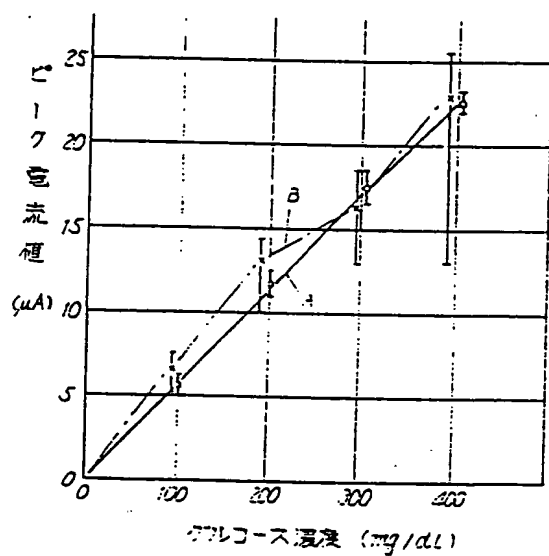
代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

第 1 図



- 1 — 多孔体
- 2 — 交換膜
- 3, 4 — 保持層
- 5 — 絶縁層
- 6 — 測定極
- 7 — 対極
- 8 — 絶縁基板
- 9 — 吸水性高分子層

第 2 図



第 3 図

